

28. 9. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 18 NOV 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 9 月 2 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 3 4 4 8 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 3 4 4 8 4]

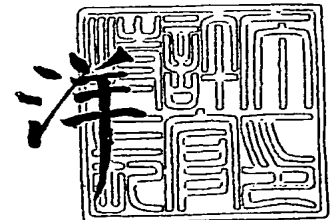
出 願 人 ヤマサ醤油株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 9 9 2 2 6

【書類名】 特許願
【整理番号】 YP2003-008
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12P 19/30
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県銚子市南小川町 2 9 3 5 - 2
 【氏名】 浜本 智樹
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県銚子市末広町 1 - 1 2
 【氏名】 長岡 邦明
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県銚子市栄町 2 - 1 - 1 2
 【氏名】 野口 利忠
【特許出願人】
 【識別番号】 000006770
 【住所又は居所】 千葉県銚子市新生町 2 丁目 1 0 番地の 1
 【氏名又は名称】 ヤマサ醤油株式会社
 【代表者】 濱口 道雄
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 056030
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

高純度の CMP-NeuAc の製造法であつて、以下の工程 (1) ~ (4) の各工程を適宜組み合わせることを特徴とする、CMP-NeuAc の製造法。

工程 (1) : CMP-NeuAc 含有液に 2 価カチオンを添加し、共存するリン酸、ピロリン酸、ヌクレオチドを沈殿させる工程、

工程 (2) : CMP-NeuAc 含有液にホスファターゼを添加し、共存するヌクレオチドをヌクレオシドに変換する工程、

工程 (3) : 有機溶媒を添加し、CMP-NeuAc を沈殿させる工程、及び

工程 (4) : 沈殿した CMP-NeuAc を回収する工程

【請求項 2】

工程 (1)、工程 (2)、工程 (3)、工程 (4) の順に実施する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

工程 (2)、工程 (1)、工程 (3)、工程 (4) の順に実施する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

工程 (1) と工程 (2) を同時に行う、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

工程 (3) と工程 (4) を複数回実施する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

2 価カチオンがカルシウム又はマンガンである、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

ホスファターゼが大腸菌アルカリホスファターゼである、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

有機溶媒が、炭素数 5 以下のアルコールである、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

工程 (4) の CMP-NeuAc の回収後、さらに塩交換反応に付し、CMP-NeuAc の塩を置換する、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 10】

イオン交換樹脂を用いる塩交換反応である、請求項 9 記載の製造法。

【書類名】明細書

【発明の名称】CMP-N-アセチルノイラミン酸の製造法

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖鎖合成の重要な原料であるCMP-N-アセチルノイラミン酸（CMP-NeuAc）の製造法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、糖鎖に関する構造及び機能に関する研究が急速に進み、生理活性を有するオリゴ糖、糖脂質、糖蛋白質などの医薬品または機能性素材としての用途開発が注目を集めている。中でも、末端にN-アセチルノイラミン酸（NeuAc）を含むシアル酸含有糖鎖は、細胞接着やウイルス感染の際の受容体となる等の重要な機能を有する糖鎖として知られている。

【0003】

シアル酸含有糖鎖は、一般にシアル酸転移酵素の触媒により合成される。なお、シアル酸転移酵素とは、CMP-N-アセチルノイラミン酸（CMP-NeuAc）を糖供与体とし、受容体となる糖鎖にシアル酸を転移させる酵素である。

【0004】

CMP-NeuAcは、基本的にはシチジン5'-トリリン酸（5'-CTP）とノイラミン酸（NeuAc）を基質として、CMP-NeuAcシンセターゼの触媒反応により合成されている。

【0005】

しかしながら、糖供与体として用いるCMP-NeuAcは、非常に不安定で大量調製が困難であることから極めて高価であり、かつ量的にも試薬レベルでの僅かな供給量でしか供給されていない。また、供給されている製品の純度も悪く（従来、純度95%以上の高純度品を取得することが容易ではなく、HPLC検定上、通常90%前後の純度を有している）、シアル酸含有糖鎖等の製造原料としては不適切なものとならざるを得ない。

【0006】

従来、CMP-NeuAcの精製法としては、反応工程中あるいは精製工程中に分解されて生成する、あるいは合成反応液中に残存するシチジン5'-モノリン酸（5'-CMP）、シチジン5'-ジリン酸（5'-CDP）及び5'-CTPとCMP-NeuAcとを分離することが非常に困難であるため、仔ウシ由来アルカリホスファターゼ（CIAP）を用いて共存する5'-CMP、5'-CDP及び5'-CTPのリン酸を除去してすべてをシチジンにした後、イオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィー処理によりCMP-NeuAcを分離する方法が好ましい方法として報告されている（J. Am. Chem. Soc., 110, 7159-7163(1988).、特開平5-276973号公報、特公平5-73391号公報、特開平8-73480号公報）。

【0007】

【特許文献1】特開平5-276973号公報

【特許文献2】特公平5-73391号公報

【特許文献3】特開平8-73480号公報

【非特許文献1】J. Am. Chem. Soc., 110, 7159-7163(1988)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、上記従来法では、手間やコスト高につながる各種クロマトグラフィー処理を必須としており、必ずしも工業的レベルの大量製造時の精製法としては好適なものとは言えなかった。また、ホスファターゼ処理に使用する仔ウシ由来アルカリホスファターゼ（CIAP）は、現在のところ大量調製が困難な酵素であり、本酵素以外のホスファターゼを使用することも要望されていた。

【0009】

また、クロマトグラフィー処理を必須としない、溶媒に対する溶解度の差を利用した分別沈殿法も報告されているものの(J. Am. Chem. Soc., 110, 7159-7163(1988))、分別沈殿法でのCMP-NeuAcの回収率及び純度とも上記クロマトグラフィー処理法には到底及ばず、実用的な方法とはなっていない。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、クロマトグラフィー処理を必要とせず、高純度のCMP-NeuAcの収率良く大量に製造するための方法に関し鋭意検討を重ねた結果、(1) CMP-NeuAc合成酵素による触媒反応終了後、速やかにリン酸と不溶性沈殿を形成しうるカルシウム、マンガンなどの2価カチオンを添加することで、反応液中に混在する無機リン酸及びピロリン酸をリン酸塩として沈殿させ、また未反応基質である5'-CTPも塩として沈殿させられることができること、(2) 2価カチオンを添加しても、ホスファターゼ反応は何ら影響されず、5'-CMP、5'-CDP、5'-CTPを特異的にシチジンに分解できること、(3) 2価カチオン添加することで、CMP-NeuAcのアルコール等の溶媒に対する沈降性が選択的に高まり、シチジン及びNeuAcとの分別沈殿が極めて容易になること、等を確認し、本発明を完成させた。

【0011】

したがって、本発明は、以下の通りである。

(1) 高純度のCMP-NeuAcの製造法であって、以下の工程1~4の各工程を適宜組み合わせることを特徴とする、CMP-NeuAcの製造法。

工程1: CMP-NeuAc含有液に2価カチオンを添加し、共存するリン酸、ピロリン酸、ヌクレオチドを沈殿させる工程、

工程2: CMP-NeuAc含有液にホスファターゼを添加し、共存するヌクレオチドをヌクレオシドに変換する工程、

工程3: 有機溶媒を添加し、CMP-NeuAcを沈殿させる工程

工程4: 沈殿したCMP-NeuAcを回収する工程

【0012】

(2) 工程1、工程2、工程3、工程4の順に実施する、上記(1)記載の方法。

(3) 工程2、工程1、工程3、工程4の順に実施する、上記(1)記載の方法。

(4) 工程1と工程2を同時に行う、上記(1)記載の方法。

(5) 工程3と工程4を複数回実施する、上記(1)記載の方法。

(6) 2価カチオンがカルシウム又はマンガンである、上記(1)~(5)のいずれかに記載の方法。

(7) ホスファターゼが大腸菌アルカリホスファターゼである、上記(1)~(5)のいずれかに記載の方法。

(8) 有機溶媒が、炭素数5以下のアルコールである、上記(1)~(5)のいずれかに記載の方法。

(9) 工程4のCMP-NeuAcの回収後、さらに塩交換反応に付し、CMP-NeuAcの塩を置換する、上記(1)記載の製造法。

(10) イオン交換樹脂を用いる塩交換反応である、上記(9)記載の製造法。

【発明の効果】

【0013】

本発明により、クロマトグラフィー処理以外では困難であった高純度のCMP-NeuAc(HPLC純度95%以上)を、クロマトグラフィー処理を用いることなく、単純な操作で容易に、しかも収率よく取得できるようになった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明のCMP-NeuAc製造工程は、上記の通り、工程1~工程4を基本としており、以下、各工程毎に詳述する。

(工程1)

工程1は、CMP-NeuAc含有液に2価カチオンを添加し、共存するリン酸、ピロリン酸、ヌクレオチドを沈殿させる工程である。

【0015】

工程1（もしくは工程2）に供するCMP-NeuAc含有液としては、CMP-NeuAcを含有する水溶液であれば特に限定されず、典型的には酵素を用いたCMP-NeuAc合成液を挙げることができ、具体的には、5'-CTPとNeuAcを基質として、CMP-NeuAcシンセターゼの触媒反応により合成されCMP-NeuAc含有液を例示することができる。

【0016】

添加する2価カチオンとしては、無機リン酸、ピロリン酸もしくはヌクレオチドと不溶性の沈殿を形成するものならば良く、具体的にはカルシウムまたはマンガンの各イオンを例示することができる。より具体的に、カルシウムイオンを添加する場合には、塩化カルシウム、硫酸カルシウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウムなどを使用し、マンガンイオンを添加する場合には塩化マンガン、硫酸マンガンなどを使用し、添加濃度としては、0.1~2000mMの範囲から適宜設定すればよい。

【0017】

このような2価カチオンをCMP-NeuAc含有液に添加し、温度0~60℃の条件下、必要によりpHを6.0~13.0に調整し、及び／又は攪拌することで、リン酸カルシウム、リン酸マンガン等の不溶塩が沈降してくるので、沈殿物を通常の固液分離手段（ろ過、遠心分離など）で取り除き、次工程に供する。

【0018】

(工程2)

工程2は、CMP-NeuAc含有液にホスファターゼを添加し、共存するヌクレオチドをヌクレオシドに変換する工程である。

【0019】

反応に使用するホスファターゼとしては、ヌクレオチドのリン酸残基を脱リンしてヌクレシドに変換できる酵素、特に、5'-CMP、5'-CDP、5'-CTPを特異的にシチジンまで加水分解できる酵素であれば良く、反応時におけるCMP-NeuAcの安定性や酵素調製の容易性などを考慮すると、大腸菌アリカリホスファターゼが好適である。

【0020】

ホスファターゼ反応は、CMP-NeuAc含有液1ml当たり0.01ユニット以上、好ましくは0.1~50ユニット添加し、70℃以下、好ましくは20~60℃で0.1~50時間程度、必要により攪拌、pHを調整しながら反応させることにより実施できる。

【0021】

なお、上記工程1と工程2は、順序は特に関係なく、どちらを先に行ってもかまわず、同時に行っても良い。たとえば、工程1、工程2の順番で実施した場合、反応後、反応液中に2価イオンが存在する場合ため、ホスファターゼ処理中あるいは処理後、リン酸カルシウム、リン酸マンガン等の不溶塩が沈降してくるので、沈殿物を通常の固液分離手段（ろ過、遠心分離など）で取り除き、次工程に供する。

【0022】

(工程3)

工程3は、有機溶媒を添加し、CMP-NeuAcを沈殿させる工程である。

【0023】

添加する有機溶媒としては、炭素数5以下のアルコールであれば特に制限されるものではなく、具体的にはメタノール、エタノール、イソプロパノール等を使用することができる。また、有機溶媒の添加量としては、反応液当たり0.1~20倍量の範囲から適宜設定することができる。

【0024】

このような有機溶媒を上記工程1または工程2の処理後の液に添加し、温度 $-80 \sim 60^{\circ}\text{C}$ の条件下、必要によりpHを $6.0 \sim 13.0$ に調整し、及び／又は攪拌することで、CMP-NeuAcが沈降してくる。

【0025】

(工程4)

工程4は、沈殿したCMP-NeuAcを回収する工程である。

【0026】

回収の方法は、通常の固液分離手段(ろ過、遠心分離等)によって行うことができ、回収後、必要により乾燥させて製品とする。

【0027】

また、上記工程3と本工程4を複数回(通常、2~5回程度)実施することで、より高純度のCMP-NeuAcを取得することができる。

【0028】

(付加工程)

上記工程4終了後、CMP-NeuAcはカルシウム塩またはマンガン塩となっているため、必要に応じて、例えばナトリウム塩等に変換することも可能である。

【0029】

塩の交換反応は、回収した沈殿を再溶解し、たとえば、目的とする塩に置換したカチオン交換樹脂に接触(当該樹脂カラムへ通液等)させることで実施することができる。

【実施例】

【0030】

以下、実験例、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明がこれに限定されないことは明らかである。なお、反応液中のCMP-NeuAcの定量はHPLC法を用いて行った。具体的には、分離にはYMC社製のODS-HS302カラムを用い、溶離液として 0.1M トリエチルアミン-リン酸(pH 6.0)を用いた。

【0031】

実験例

(1) 2価イオンの添加効果

0.2M NeuAc溶液を 5ml 、 0.25M CTP $\cdot 3\text{Na}$ 溶液を 4ml 、 1M 塩化マグネシウム溶液を混合後、 2M 水酸化ナトリウム溶液でpHを 10 に調製し、蒸留水で 50ml にフィルアップした。 40°C に加熱した後、 70 ユニットのCMP-NeuAcシンセターゼを添加し、攪拌しながら反応を開始した。反応中、反応液のpHを 8.5 付近を維持するために 1M 水酸化ナトリウム溶液を適時滴下した。

【0032】

反応開始1時間後、 1M 塩化カルシウム溶液 3ml を添加後、続けて 5 ユニットの大腸菌アルカリホスファターゼを添加し、さらに 40°C で攪拌しながら反応を行った。反応中、反応液のpHを 9.0 付近に維持するために 1M 水酸化ナトリウム溶液を適時滴下した。

【0033】

30 分後、一部をサンプリングしてHPLCにより反応液組成を分析したところ、下記表1に示すような結果が得られた。また、上記と同様にCMP-NeuAc合成を1時間行った後、 1M 塩化マンガン溶液 3ml もしくは蒸留水 3ml 添加した後、同様に大腸菌アルカリホスファターゼ反応を行い、 30 分後にサンプリングした時の反応液組成も併記した。

【0034】

表1より、2価カチオンを添加することで大腸菌アルカリホスファターゼ反応を効率良く行え、特にCMP-NeuAcとの分離が困難であるCMPを効率的に除去できることが明らかになった。

【0035】

【表1】

	CMP-NeuAc	CTP	CMP	シチジン	ウリジン
CaCl ₂	14.57mM	< 0.02mM	< 0.02mM	1.283mM	0.7932mM
MnCl ₂	11.17mM	< 0.02mM	< 0.02mM	0.7051mM	0.5031mM
蒸留水	16.34mM	0.8625mM	0.8065mM	0.0541mM	0.1127mM

【0036】

(2) エタノール沈殿への2価イオン添加効果

CMP-NeuAc・2ナトリウム塩粉末70mg(シグマ社製)を蒸留水で溶解し、500 μ lに調製した(約0.2M溶液)。これを100 μ lずつ分取した後、それぞれA. 1M塩化カルシウム溶液、B. 1M塩化マンガン溶液、C. 蒸留水を50 μ l添加した。続いてそれぞれ300 μ lのエタノールを添加し、4℃で一晩静置した後、121,000xg、4℃、10分間の遠心分離を行い、得られた上清の270nmにおける吸光度を測定した。得られた測定値から沈殿画分としての回収率を算出したところ、表2に示すような結果が得られた。

【0037】

表2から明らかなように、リン酸と不溶性の沈殿を形成しうる2価カチオンを添加することでエタノール沈殿処理におけるCMP-NeuAcの回収率が飛躍的に向上することが明らかとなった。

【0038】

【表2】

	沈殿回収率(%)
CaCl ₂	89.7
MnCl ₂	55.4
蒸留水	0.40

【0039】

実施例1

NeuAcを12.4g(マルキン忠勇社製)、5'-CTP・2Na塩を24.2g(ヤマサ社製)、1M塩化マグネシウム溶液を100ml添加、溶解した後、1M水酸化ナトリウムでpHを9.5に調整し、蒸留水で2Lにフィルアップした。40℃に加温した後、2,810ユニットのCMP-NeuAcシンセターゼを添加し、攪拌しながら反応を開始した。反応中にpHを8.5付近に維持するために1M水酸化ナトリウム溶液を適時滴下した。

【0040】

反応開始1時間後、2.5M塩化カルシウム50mlを添加後、続けて200ユニットの大腸菌アルカリホスファターゼを添加し、さらに40℃で攪拌しながら反応を行った。反応中にpHを9.0付近に維持するために1M水酸化ナトリウム溶液を適時滴下した。

【0041】

ホスファターゼ反応1時間後、反応液を4℃まで冷却した。一晩放置後、遠心分離(15,000xg、15分)により沈殿物を除去した。得られた上清を1M塩化水素溶液でpH7.0に調整後、カーボン粉末2g添加し、氷中で1時間攪拌した。0.45 μ mフィルターを用いてカーボン粉末を除去した後、得られたろ液2.03Lをエバポレータ

ーで約 100 ml まで濃縮した。

【0042】

濃縮中に生成した沈殿を G3 ガラスフィルターを用いて除去した後、得られたろ液 140 ml に対してエタノールを 660 ml 添加し、室温で攪拌した後、さらに 4℃で攪拌、一晩放置した。

【0043】

G3 ガラスフィルターで沈殿を回収した後、減圧乾燥を行い、これを蒸留水で 150 ml に溶解し、エタノールを 450 ml 添加、室温で攪拌後、さらに 4℃で攪拌、一晩放置した。

【0044】

G3 ガラスフィルターで沈殿を回収後、減圧乾燥を行い、これを蒸留水で 250 ml に溶解し、ナトリウムイオンで置換させた PK216 (Na) 樹脂 (三菱化学社製) カラム 100 ml に 400~450 ml/h の流速で通液させた。

【0045】

CMP-NeuAc を含む画分 370 ml を回収し、エバポレーターで 50 ml 位まで濃縮した後、1M 塩化水素溶液で pH を 7.0 に調整した。

【0046】

これにカーボン粉末 0.5 g 添加、水中で約 1 時間攪拌した後、0.45 μm フィルターを用いてカーボン粉末を除去した。得られたろ液 70 ml に対してエタノールを 400 ml 添加し、室温で攪拌した後、さらに 4℃で一晩攪拌した。沈殿を G3 ガラスフィルターを用いて回収し、これを減圧乾燥することで HPLC 純度 98.1% の CMP-NeuAc・2 ナトリウム塩粉末を 18.4 g 取得した。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 クロマトグラフィー処理以外では困難であった高純度のCMP-N-アセチルノイラミン酸（HPLC純度95%以上）を、クロマトグラフィー処理を用いることなく、単純な操作で容易に、しかも収率よく取得できる方法を提供する。

【解決手段】 高純度のCMP-N-アセチルノイラミン酸（CMP-NeuAc）の製造法であって、以下の工程1～4の各工程を適宜組み合わせて行うことを特徴とする、CMP-NeuAcの製造法に関する。

工程1：CMP-NeuAc含有液に2価カチオンを添加し、共存するリン酸、ピロリン酸、ヌクレオチドを沈殿させる工程、

工程2：CMP-NeuAc含有液にホスファターゼを添加し、共存するヌクレオチドをヌクレオシドに変換する工程、

工程3：有機溶媒を添加し、CMP-NeuAcを沈殿させる工程

工程4：沈殿したCMP-NeuAcを回収する工程

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-334484
受付番号	50301585513
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 9月29日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 9月26日

特願 2 0 0 3 - 3 3 4 4 8 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 6 7 7 0]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

千葉県銚子市新生町 2 丁目 1 0 番地の 1

氏 名

ヤマサ醤油株式会社